



IDENTIFIKASI *Plasmodium vivax* MENGGUNAKAN METODE NESTED PCR DI WILAYAH ENDEMIS MALARIA PROVINSI NUSA TENGGARA TIMUR

Dewi Inderiati^{1*}, Sarwo Handayani², Danesya Syaeptiani¹,
Ni Putu Aryadnyani¹

¹Jurusan Teknologi laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Jakarta III, Jakarta, Indonesia

²Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI, Jakarta, Indonesia

e-Mail: dregina.biomedic@gmail.com

Abstract

East Nusa Tenggara Province has one of the highest malaria prevalence rates in Indonesia (1.99 percent) and is one of the locations where malaria is expected to be eradicated by 2030. Only young erythrocytes are infected by *P. vivax*, resulting in a low parasite density in the blood. As a result, *P. vivax* is difficult to detect, necessitating the employment of an appropriate diagnostic procedure. With the advancement of molecular biology, it is now possible to diagnose malaria using the nested PCR method, resulting in more sensitive and specific results. The goal of this study was to identify *P. vivax* in 135 whole blood samples from people of Oenino District, South Central Timor Regency, East Nusa Tenggara Province, using the nested PCR method. In this study, 8 (5.92%) of the samples tested positive for *Plasmodium* sp., with 5 (3.70%) of the samples being *P. vivax*. Patients with vivax malaria were mostly men (40.0%) and women (60.0%), with ages ranging from 31 to 50 years (40.0%), 41 to 50 years (20.0%), and > 50 years (20.0%). (40.0 %). A total of three patients (40.0 %) experienced clinical signs of fever and anemia (20.0 %). Based on this results of a *P. vivax* examination, the PCR approach might be utilized. The discovery of *P. vivax* in the community needs to be concern for the government, particularly in terms of malaria treatment monitoring and assessment in order to prevent relapse, increase malaria cases, and promote the effectiveness of malaria elimination initiatives.

Keyword: malaria, nested PCR, East Nusa Tenggara, *Plasmodium vivax*.

Abstrak

Provinsi Nusa Tenggara Timur menjadi salah satu wilayah dengan prevalensi malaria tertinggi di Indonesia (1,99%) dan merupakan wilayah target eliminasi malaria di tahun 2030. *P. vivax* hanya menginfeksi eritrosit muda sehingga menyebabkan kepadatan parasit yang rendah di dalam darah. Hal tersebut menyebabkan *P. vivax* sulit dideteksi sehingga diperlukan metode tepat dalam menegakkan diagnosis. Adanya perkembangan biologi molekuler memungkinkan diagnosis malaria dapat ditegakkan menggunakan metode *nested* PCR sehingga didapatkan hasil yang lebih sensitif dan spesifik. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan identifikasi *P. vivax* menggunakan metode *nested* PCR terhadap 135 sampel *whole blood* dari penduduk yang tinggal di Kecamatan Oenino, Kabupaten Timor Tengah Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Dari penelitian ini didapatkan hasil sebanyak 8 (5,92%) sampel positif *Plasmodium* sp dengan 5 (3,70%) sampel diantaranya teridentifikasi sebagai *P. vivax*. Karakteristik penderita malaria

vivaks terdiri dari laki-laki (40,0%) dan perempuan (60,0%) dengan rentang usia 31-40 tahun (40,0%), 41-50 tahun (20,0%), dan >50 (40,0%). Sebanyak 3 orang memiliki gejala berupa demam (40,0%) dan anemia (20,0%). Metode PCR dapat digunakan sebagai alternatif pemeriksaan *P. vivax*. Ditemukannya *P. vivax* pada penduduk perlu menjadi perhatian pemerintah terutama pemantauan dan evaluasi pengobatan malaria agar tidak terjadi *relaps*, peningkatan kasus malaria dan untuk menunjang keberhasilan program eliminasi malaria.

Kata Kunci: Malaria, *Plasmodium vivax*, nested PCR, Nusa Tenggara Timur

PENDAHULUAN

Tingginya kasus malaria di Indonesia dapat memberikan dampak terhadap kualitas hidup dan ekonomi masyarakat serta dapat menurunkan produktifitas kerja. Kasus malaria di Indonesia banyak dilaporkan terjadi pada wilayah bagian timur Indonesia (Pusdatin, 2011). Hasil Riskesdas 2018 menyatakan bahwa prevalensi malaria di Indonesia berdasarkan riwayat pemeriksaan darah mengalami penurunan dari tahun 2013 (1,4%) hingga tahun 2018 (0,4%) dengan tingkat prevalensi tertinggi di daerah Papua (12,07%), Papua Barat (8,64%), dan Nusa Tenggara Timur (1,99%). Nusa Tenggara Timur (NTT) menjadi salah satu wilayah dengan kabupaten atau kota yang belum mencapai eliminasi malaria di kawasan timur Indonesia (Kemenkes, 2019).

Terdapat lima spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi*. *P. vivax* menjadi spesies yang terdistribusi luas di berbagai wilayah dunia sebagai penyebab malaria (Kemenkes, 2013; WHO, 2018). *P. vivax* hanya menginfeksi eritrosit muda sehingga menyebabkan kepadatan parasit yang rendah di dalam darah. Selain itu, adanya fase hipnozoit pada *P. vivax* dapat menimbulkan *relaps* pada penderita. Hal tersebut menyebabkan *P. vivax* sulit dideteksi sehingga diperlukan metode yang tepat dalam menegakkan diagnosis (Kemenkes, 2013; WHO, 2015).

Pemeriksaan mikroskopis dianggap sebagai baku emas dalam menegakkan diagnosis malaria. Namun, pemeriksaan mikroskopis sangat bergantung pada keterampilan petugas sehingga akurasinya dapat menurun

(Kemenkes, 2014; Puasa, 2018; Herman, 2011). Adanya perkembangan biologi molekuler memungkinkan diagnosis malaria dapat dilakukan dengan metode PCR yang lebih sensitif dan spesifik karena mampu mendeteksi DNA dalam kondisi parasitemia ≤ 5 parasit/ μL . Salah satu metode yang sering digunakan dalam diagnosis malaria adalah *nested* PCR yang mampu mendeteksi < 10 parasit/ μL . Pada *nested* PCR digunakan dua pasang primer (rPLU 1 dan rPLU 5; rPLU 3 dan rPLU 4) sehingga didapatkan target DNA yang lebih spesifik untuk diamplifikasi (Syaifudin 2016; Miguel-oteo, 2017; dan Alzohairy, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *P. vivax* menggunakan metode *nested* PCR pada wilayah endemis malaria Provinsi Nusa Tenggara Timur.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel yang digunakan merupakan bahan biologis tersimpan (BBT) berupa *whole blood* yang berasal dari warga Kecamatan Oenino, Kabupaten Timor Tengah Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur dan disimpan di Laboratorium Parasitologi Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Pengambilan sampel telah dilakukan pada tahun 2014 - 2015.

Sebanyak 135 sampel diekstraksi untuk mendapatkan DNA menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Cat. A-1120) sesuai dengan petunjuk brosur (Promega Corporation, 2019). Hasil isolasi DNA dinilai secara kuantitatif melalui pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan Nanovue 4282 (V2.0.4).

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan metode *nested* PCR sesuai dengan protocol (Snounou, 1993). Proses amplifikasi dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama digunakan primer rPLU 1 (5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3') dan rPLU 5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3') dengan amplikon

1640 bp serta primer rPLU 3 (5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGC AAA AGC TGT-3') dan rPLU 4 (5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3') dengan amplikon 240 bp sesuai target *Plasmodium* pada manusia. Sampel dengan genus positif akan diamplifikasi kembali menggunakan primer rVIV 1 (5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3') dan rVIV 2 (5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3') dengan amplikon 121 bp untuk mendeteksi *P. vivax*. *Template* DNA yang digunakan adalah hasil amplifikasi menggunakan primer rPLU 1 dan rPLU 5 (Douki, 2018).

Komponen mix yang digunakan adalah GoTaq® Green Master Mix M712B (Promega) sebanyak 12,5 µL, primer rPLU 1 dan rPLU 5 sebanyak 2 µL, primer rPLU 3, rPLU 4, rVIV 1, dan rVIV 2 sebanyak 1,8 µL (Promega Corporation, 2018). Volume akhir untuk *nested* 1 sebanyak 25 µL dan *nested* 2 sebanyak 20 µL. Kondisi PCR yang digunakan pada *nested* 1: 94°C selama 4 menit sebanyak 1 siklus, 30 siklus pada denaturasi (94°C selama 1 menit), *annealing* (55°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 2 menit), diikuti ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit (1 siklus). Kondisi PCR pada *nested* 2: 94°C selama 4 menit sebanyak 1 siklus, 45 siklus untuk *Plasmodium* pada denaturasi (94°C selama 30 detik), *annealing* (62°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 30 detik), 45 siklus untuk *P. vivax* pada denaturasi (94°C selama 30 detik), *annealing* (55°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 45 detik) diikuti ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit (1 siklus). Produk PCR *nested* 2 divisualisasi menggunakan agarose 2% dengan 4 µL *ethidium bromide* (EtBr) pada tegangan 80 volt selama 60 menit. Hasil visualisasi diamati menggunakan *Geldoc* (Biorad). Hasil positif *Plasmodium* akan menunjukkan pita pada 240 bp dan *P. vivax* pada 121 bp (Snounou, 1993).

HASIL

Sebanyak 135 sampel *whole blood* warga Kecamatan Oenino, Kabupaten Timor Tengah Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur berhasil diekstraksi untuk

mendapatkan *template* DNA. Kualitas DNA diukur secara kuantitatif melalui pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Konsentrasi DNA

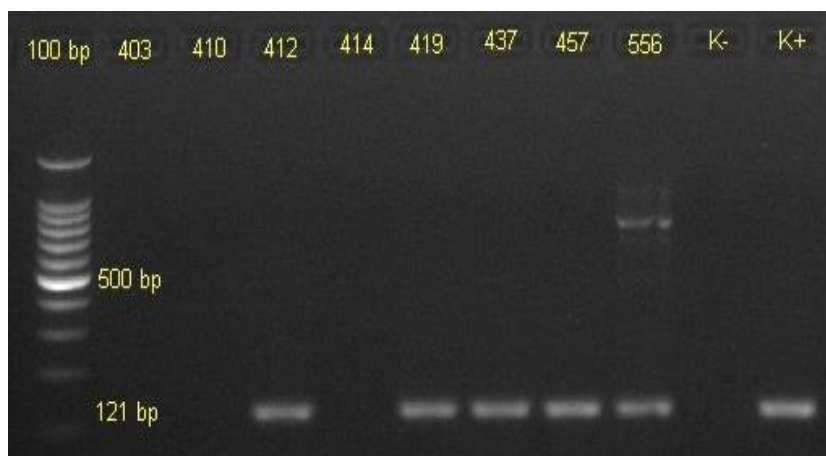
Konsentrasi DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	n	%
<10	17	12,6
10 - 100	63	46,7
>100	55	40,7
Total	135	100

Dari tabel 1 diketahui bahwa sebagian besar sampel (46,7%) memiliki konsentrasi pada rentang 10 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40,7% sampel dengan konsentrasi > 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 12,6% sampel dengan konsentrasi < 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Konsentrasi DNA didapatkan dari pengukuran absorbans pada panjang gelombang 260 nm. Hasil kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Kemurnian DNA

Kemurnian DNA	n	%
<1.80	56	41,5
1.80 - 2.00	61	45,2
>2.00	18	13,3
Total	135	100

Pada Tabel 2 sebanyak 61 (45,2%) sampel memiliki kemurnian pada rentang 1.80 - 2.00, 56 (41,5%) sampel dengan kemurnian <1.80, dan 18 (13,3%) sampel dengan kemurnian >2.00. Kemurnian DNA didapat dari rasio nilai absorbans ($A_{260}:A_{280}$). DNA dinyatakan murni apabila memiliki nilai rasio sebesar 1.80 - 2.00. Setelah dilakukan pengukuran terhadap isolat DNA, tahap amplifikasi dilakukan pada seluruh sampel menggunakan metode *nested* PCR. Hasil visualisasi elektroforesis *P. vivax* dapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis *P. vivax*

Kolom 1: DNA *Ladder* 100 bp; Kolom 2 - 9: Sampel nomor 403, 410, 412, 414, 419, 437, 457, dan 556; Kolom 10: Kontrol negatif; Kolom 11: Kontrol positif

Hasil positif *Plasmodium* terdapat pada sampel 403, 410, 412, 414, 419, 437, 457, dan 556. Dari 8 sampel positif *Plasmodium* diketahui terdapat 5 sampel positif *P. vivax* pada sampel nomor 412, 419, 437, 457, dan 556 yang menunjukkan pita sesuai target di 121 bp. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, proporsi penderita malaria dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data jumlah Proporsi Penderita Malaria

Identifikasi	Positif		Negatif		Total (%)
	n	%	n	%	
<i>Plasmodium</i>	8	5,92	127	94,08	135 (100,0)
<i>Plasmodium vivax</i>	5	3,70	130	96,30	135 (100,0)

Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa dari 135 sampel yang telah dikerjakan, terdapat 8 (5,92%) sampel berasal dari penderita malaria dan 5 (3,70%) diantaranya merupakan infeksi *P. vivax*.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, karakteristik penderita malaria vivaks dapat diketahui melalui Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik Penderita Malaria Vivaks

Karakteristik	n	%
Jenis Kelamin		
Laki-laki	2	40,0
Perempuan	3	60,0
Umur		
31-40 tahun	2	40,0
40-50 tahun	1	20,0
>50 tahun	2	40,0
Demam		
Ya	2	40,0
Tidak	3	60,0
Anemia		
Ya	1	20,0
Tidak	4	80,0
Total	5	100,0

Berdasarkan Tabel 4, karakteristik penderita malaria vivaks didominasi oleh perempuan (60,0%) dengan kelompok usia penderita paling banyak berada di rentang 31 - 40 tahun dan >50 tahun dengan masing-masing jumlah sebanyak 2 (40,0%) orang. Sebagian besar penderita mengalami demam (60,0%) dan tidak memiliki anemia (80,0%).

DISKUSI

Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan No: 293/Menkes/SK/IV/2009 tentang eliminasi malaria di Indonesia, Nusa Tenggara Timur menjadi salah satu wilayah target eliminasi malaria demi tercapainya program eliminasi secara nasional di tahun 2030. Pada tahun 2015, NTT termasuk ke dalam stratifikasi wilayah endemis tinggi malaria (bila API >5 ‰) dengan nilai API sebesar 7,06‰. Kabupaten Timor Tengah Selatan (TTS) merupakan salah satu kecamatan di NTT yang belum terbebas dari kasus malaria. Hal ini dapat dilihat dari data yang disajikan Badan Pusat Statistik Kabupaten Timor Tengah Selatan bahwa dari 31.320 kasus malaria di NTT pada tahun 2016, terdapat sebanyak 8.775 (28%) kasus berasal dari kabupaten TTS. Data terbaru menunjukkan bahwa terdapat penurunan kasus malaria di kabupaten TTS sebanyak 7.230

kasus sehingga jumlahnya menjadi 1.545 kasus malaria di tahun 2017. Kecamatan Oenino merupakan salah satu dari 32 kecamatan yang berada di kabupaten TTS. Data yang berhasil didapatkan peneliti mengenai sebaran kasus malaria di Kecamatan Oenino pada tahun 2016 berjumlah kasus sebanyak 17 kasus (Pusdatin, 2016; dan Badan Pusat Statistik Kabupaten Timor Tengah Selatan, 2017).

Penelitian ini menggunakan metode *nested* PCR dalam mengidentifikasi *P. vivax*. Target dalam penelitian ini adalah gen 18S rRNA yang sering digunakan sebagai penanda dalam mendeteksi malaria. 18S rRNA tersusun dari area konserve yang dapat digunakan sebagai target dalam mendeteksi *Plasmodium* sp. dan zona variabel yang memungkinkan untuk mendeteksi spesies *Plasmodium* (Douki, 2018).

Sebelum proses PCR dilakukan, penting untuk mengetahui kualitas DNA yang akan digunakan melalui pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA untuk mengetahui adanya kontaminasi dalam sampel. Konsentrasi DNA yang dibutuhkan untuk amplifikasi PCR adalah 10 - 100 µg/mL. Konsentrasi DNA yang rendah (<10 µg/mL) menjadi salah satu faktor yang dapat menyebabkan kemurnian DNA menjadi rendah (Mustafa, 2016; Nugroho, 2016; dan Fathimah, 2017). Namun, dalam penelitian ini tidak semua sampel dengan konsentrasi rendah juga memiliki kemurnian DNA yang rendah. Nilai konsentrasi tidak berbanding lurus dengan nilai kemurnian dikarenakan nilai kemurnian dipengaruhi oleh nilai kontaminan yang diserap pada panjang gelombang 280 nm (Iqbal, 2016). Hasil konsentrasi DNA kemungkinan dipengaruhi oleh teknik pengerjaan selama proses isolasi DNA berlangsung. Tinggi rendahnya konsentrasi DNA dipengaruhi oleh suhu dan waktu inkubasi saat isolasi DNA. Peningkatan konsentrasi DNA dipengaruhi oleh banyaknya volume darah yang digunakan saat proses isolasi (Nugroho, 2015; Komalasari, 2009).

Kemurnian DNA didapat dari nilai rasio pada $A_{260}:A_{280}$. DNA dikatakan murni bila berada pada rentang 1,8 - 2,0. Kemurnian DNA yang rendah atau tinggi dikarenakan adanya kontaminasi protein atau fenol pada DNA. Kemurnian

DNA <1.80 menunjukkan adanya kontaminan dari senyawa yang digunakan saat proses ekstraksi berlangsung, sedangkan kemurnian >2.00 menunjukkan adanya buffer yang terbawa saat proses isolasi (Mustafa, 2016; Goodwin,2007; dan Nugroho,2017).

Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 8 (5,92%) dari 135 sampel yang telah dianalisis positif mengandung *Plasmodium* dengan 5 (3,70%) sampel diantaranya merupakan infeksi *P. vivax*. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa spesies *Plasmodium* yang paling banyak ditemukan di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax* (Kemenkes, 2013). Studi literatur terbaru menyatakan bahwa kasus infeksi *P. falciparum* dan *P. vivax* di Indonesia hampir setara (Lee, 2019). Sesuai dengan teori yang telah dijabarkan, 3 (37,5%) sampel negatif *P. vivax* pada 8 penderita malaria kemungkinan berasal dari infeksi *P. falciparum*. Sampel merupakan populasi sehat, namun masih ditemukan penderita malaria pada populasi tersebut. Gejala klinis penderita malaria di daerah endemis tinggi sering kali bersifat asimtomatis walaupun parasit ada di dalam tubuh penderita. Hal tersebut disebabkan karena adanya perubahan tingkat resistensi terhadap *Plasmodium* akibat tingginya frekuensi kontak dengan parasit (Hakim, 2011). Adanya fase hipnozoit pada *P. vivax* diduga menjadi salah satu penyebab gejala pada penderita sulit dideteksi. Oleh karena itu, dibutuhkan metode yang tepat dalam mendeteksi *P. vivax* sehingga penderita dalam diberikan penanganan yang tepat dan cepat (WHO, 2015).

Adanya perkembangan dalam teknik molekuler memungkinkan diagnosis malaria dapat dilakukan menggunakan metode PCR. Metode PCR yang paling banyak diterapkan dan telah divalidasi dalam diagnosis malaria adalah *nested* PCR. Terdapat 2 tahapan amplifikasi yang dilakukan pada kondisi berbeda. Pada amplifikasi awal digunakan primer genus dengan panjang sekuen yang luas lalu selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan primer spesies yang spesifik untuk memastikan diagnosis. Metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi sebab mampu mendeteksi hingga 1 parasit/ μ L darah (Baird, 2016).

Hasil penelitian ini dapat dikatakan valid karena kontrol positif

menunjukkan pita sesuai target (Gambar 1). Tidak adanya pita pada seluruh kontrol negatif (*nuclease free water* (NFW)) menunjukkan bahwa penelitian ini bebas dari kontaminasi. Pita DNA yang terbentuk pada setiap visualisasi penelitian ini menunjukkan hasil yang tebal dan jelas. Kualitas DNA dapat dikatakan baik apabila terbentuk pita yang kompak dan tidak terdapat *smear*. DNA *smear* merupakan DNA berukuran kecil yang terpotong-potong disebabkan oleh kemurnian hasil isolasi DNA yang rendah (Ngaliyatun,2013). Dalam penelitian ini terdapat 1 sampel yang memiliki pita lebih dari satu, yaitu no. 556 baik pada visualisasi genus maupun spesies. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kurang spesifiknya penempelan primer sehingga terjadi amplifikasi pada daerah yang bukan menjadi target. Hasil pita yang tebal pada ukuran 121 bp menunjukkan bahwa sampel no. 556 positif mengandung *P. vivax*. Namun, bila diamati dengan teliti terdapat pita tipis yang cukup jelas di sekitar ukuran 800 bp. Kemungkinan pada sampel no. 556 terdapat infeksi campuran sehingga mengandung spesies lain dari *Plasmodium* sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap sampel tersebut, baik menggunakan metode yang sama dengan primer yang spesifik atau dapat juga menggunakan sekuensing.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode *nested* PCR dapat digunakan dalam menegakkan diagnosis malaria di wilayah endemis pada kasus asimtomatis. Hal ini dapat dilihat melalui ditemukannya 8 penderita malaria dari 135 sampel yang berasal dari populasi sehat warga Kecamatan Oenino dengan proporsi infeksi *P. vivax* sebanyak 62,5%. Ditemukannya *P. vivax* pada penduduk perlu menjadi perhatian pemerintah setempat untuk melakukan pemantauan dan evaluasi pengobatan malaria agar tidak terjadi *relaps* dan peningkatan kasus malaria guna menunjang keberhasilan program eliminasi malaria.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. Vivi Setiawaty, M. Biomed selaku Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan atas izin yang telah diberikan untuk melakukan penelitian dan pengambilan data. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Jontari Hutagalung, MPH., drh. Rita Marleta Dewi, M. Kes. serta seluruh staff Laboratorium Parasitologi Puslitbang dan Teknologi Kesehatan Dasar yang telah membantu penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penelitian ini telah dikerjakan oleh suatu tim yang solid dan setiap anggota telah menyelesaikan setiap pekerjaannya dengan baik serta masing-masing tidak ada konflik kepentingan.

REFERENSI

- Alzohairy, A. M. (2015). Nested PCR. Zagazig: Departement of Genetic Zagazig University.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Timor Tengah Selatan. (2017). Prevalensi Malaria di Kabupaten Timor Tengah Selatan.
- Baird, J. K. *et al.* (2016). Diagnosis and Treatment of Plasmodium vivax Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol 95 No 6: 35-51. doi: 10.4269/ajtmh.16-0171.
- Douki, J. B. L. and Boundenga, L. (2018). Genotyping for Plasmodium spp.: Diagnosis and Monitoring of Antimalarial Drug Resistance. *Intech*. p: 108-125. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Fathimah, N. (2017). Gambaran Polimorfisme Gen CYP1A1*2ARS4646903 (T>C) sebagai Faktor Risiko Kanker Kolorektal Pada Mahasiswa Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. Skripsi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Goodwin, W., Linacre, A. and Hadi, S. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. England: John Wiley & Sons. doi:

10.1017/CBO9781107415324.004.

- Hakim, L. (2011). Malaria Epidemiologi dan Diagnosis. *Aspirator*. Vol 3 No 2: 107-116. doi: 10.22435/aspirator.v3i2.2965.
- Herman, R. *et al.* (2011). Deteksi dan Spesiasi Parasit Malaria Sampel Monitoring Pengobatan Dihydroartemisinin-Piperaquine di Kalimantan dan Sulawesi: Mikroskopis Vs Polymerase Chain Reaction. *Media Litbang Kesehatan*. Vol 21 No 3: 104-110.
- Iqbal, M., Dwi Buwono, I. and Kurniawati, N. (2016). Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*. Vol VII No 1: 54-65.
- Kemenkes. (2013). Pedoman Tata Laksana Malaria. Dalam *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2013 Tentang Pedoman Tata Laksana Malaria*. Kementerian Kesehatan RI. p: 7-26.
- Kemenkes. (2014). Pedoman Manajemen Malaria. Kementerian Kesehatan.
- Kemenkes. (2019). Laporan Nasional Riskesdas 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Komalasari, K. (2009). Pengaruh Perbandingan Volume Darah dan Lisis Buffer Serta Kecepatan Sentrifugasi Terhadap Kualitas Produk DNA Pada Sapi Friesian Holstein (FH). Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Lee, J. and Ryu, J. S. (2019). Current Status of Parasite Infections in Indonesia: A Literature Review. *Korean Journal of Parasitology*. Vol 57 No 4: 329-339. doi: 10.3347/kjp.2019.57.4.329.
- Miguel-Oteo, M. *et al.* (2017). Nested Multiplex PCR for Identification and Detection of Human Plasmodium Species including Plasmodium knowlesi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Vol 10 No 3: 299-304. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.03.014.
- Mustafa, H., Rachmawati, I. and Udin, Y. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk Anopheles barbirostris. *Jurnal Vektor Penyakit*. Vol 10 No 1: 7-10. doi: 10.22435/vektor.v10i1.6251.7-10.
- Ngaliyatun, Widiyanti, T. and Syaifudin, M. (2013). Uji Daya Infektivitas Plasmodium berghei Iradiasi Pada Hati, Limpa Mencit Menggunakan Nested-PCR. *Unnes Journal of Life Sciences*. Vol 2 No 2: 111-117.
- Nugroho, F. A. D. (2015). *Identifikasi Pola Haplotipe DNA Mitokondria Udang Jari (Metapenaeus elegans) Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah Menggunakan Enzim Restriksi HindIII*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nugroho, K. *et al.* (2016). Metode Ekstraksi DNA Pada Jatropha spp. Tanpa

- Menggunakan Nitrogen Cair. *Jurnal Littri*. Vol 22 No 4: 159-166. doi: 10.21082/littri.v22n4.2016.159-166.
- Nugroho, K., Terryana, R. T. and Lestari, P. (2017) 'Metode Ekstraksi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) Tanpa Nitrogen Cair', *Scripta Biologica*, 4(2), pp. 91-94. doi: 10.20884/1.sb.2017.4.2.423.
- Promega Corporation. (2018). GoTaq® Green Master Mix: Instruction Manual Cat. M712B. Madison: Promega Corporation.
- Promega Corporation. (2019). Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Instruction Manual, Cat. No. A1120. Madison: Promega Corporation.
- Puasa, R., Asrul, A. and Kader, A. (2018). Identifikasi Plasmodium Malaria di Desa Beringin Jaya Kecamatan Oba Tengah Kota Tidore Kepulauan. *Jurnal Riset Kesehatan*. Vol 7 No. 1: 21-24. doi: 10.31983/jrk.v7i1.3056.
- Pusdatin. (2011). Epidemiologi Malaria di Indonesia. Dalam *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*. Kementerian Kesehatan RI.
- Pusdatin. (2016). InfoDatin Malaria. *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. p: 1-7.
- Snounou, G. *et al.* (1993). High Sensitivity of Detection of Human Malaria Parasites by the Use of Nested Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol 61 No 2: 315-320. doi: 10.1016/0166-6851(93)90077-B.
- Syaifudin, M., Darlina and Nurhayati, S. (2016). Deteksi Spesies Parasit Malaria Berbasis 18S RRNA dan Uji Resistensinya Terhadap Obat Untuk Gen DHPS sebagai Pendukung Pengembangan Vaksin Malaria Iradiasi. p: 7-13.
- WHO. (2015). *Control and Elimination of Plasmodium Vivax Malaria - A Technical Brief*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2015). *Control and Elimination of Plasmodium vivax Malaria - A Technical Brief*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2018). *World Malaria Report 2018*. Geneva: World Health Organization.
-